



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0083651
Application Number

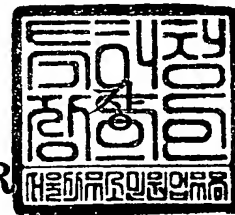
출원 년 월 일 : 2003년 11월 24일
Date of Application NOV 24, 2003

출원인 : 경상남도 외 1명
Applicant(s) KYONGSANGNAM-DO, et al.



2004 년 01 월 09 일

특 허 청
COMMISSIONER





【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2003.11.24
【발명의 명칭】	돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩
【발명의 영문명칭】	cDNA chip for screening specific genes and analyzing their function in swine
【출원인】	
【명칭】	경상남도
【출원인코드】	2-1998-700639-1
【출원인】	
【성명】	김철욱
【출원인코드】	4-1998-025596-2
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	2003-050652-8
【포괄위임등록번호】	1999-048511-1
【발명자】	
【성명】	김철욱
【출원인코드】	4-1998-025596-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	여정수
【성명의 영문표기】	YEO, Jung Sou
【주민등록번호】	500510-1800817
【우편번호】	706-092
【주소】	대구광역시 수성구 지산2동 화성맨션 107동 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이정규
【성명의 영문표기】	LEE, Jung Gyu
【주민등록번호】	580303-1923714

【우편번호】	660-080
【주소】	경상남도 진주시 이현동 235-1번지 덕산아파트 407호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	송영민
【성명의 영문표기】	SONG,Young Min
【주민등록번호】	561025-1830315
【우편번호】	660-320
【주소】	경상남도 진주시 상대동 현대아파트 109동 1307호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조광근
【성명의 영문표기】	CHO,Kwang Keun
【주민등록번호】	591221-1531620
【우편번호】	130-080
【주소】	서울특별시 동대문구 이문동 삼성래미안아파트 203동 1304호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정기화
【성명의 영문표기】	CHUNG,Ki Hwa
【주민등록번호】	570505-1917220
【우편번호】	660-764
【주소】	경상남도 진주시 상대2동 상대한보아파트 103동 709호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김일석
【성명의 영문표기】	KIM,Il Suk
【주민등록번호】	570910-1772810
【우편번호】	442-370
【주소】	경기도 수원시 팔달구 매탄동 동남빌라 10동 202호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 진상근
【성명의 영문표기】 JIN,Sang Keun
【주민등록번호】 600518-1920513
【우편번호】 660-110
【주소】 경상남도 진주시 평거동 401번지 벽산 동신아파트 101동 903호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박수현
【성명의 영문표기】 PARK,Su Hyun
【주민등록번호】 750228-2829619
【우편번호】 660-010
【주소】 경상남도 진주시 중안동 1-1번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정지원
【성명의 영문표기】 JUNG,Ji Won
【주민등록번호】 800926-2831216
【우편번호】 660-340
【주소】 경상남도 진주시 상평동 275-73번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이민정
【성명의 영문표기】 LEE,Min Jung
【주민등록번호】 810527-2918414
【우편번호】 660-330
【주소】 경상남도 진주시 하대동 304-12번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 권은정
【성명의 영문표기】 KWON,Eun Jung
【주민등록번호】 730525-2829214

【우편번호】	660-770
【주소】	경상남도 진주시 주악동 금호석류마을 110동 101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조은석
【성명의 영문표기】	CH0,Eun Segk
【주민등록번호】	791228-1829221
【우편번호】	660-290
【주소】	경상남도 진주시 주악동 161-8번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조확래
【성명의 영문표기】	CH0,Hwok Rai
【주민등록번호】	790707-1891918
【우편번호】	636-803
【주소】	경상남도 의령군 의령읍 동동리 1063번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신선민
【성명의 영문표기】	SHIN,Sun Min
【주민등록번호】	830711-2829610
【우편번호】	660-300
【주소】	경상남도 진주시 가좌동 주공아파트 101동 1307호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	남희선
【성명의 영문표기】	NAM,Hee Sun
【주민등록번호】	831002-2829713
【우편번호】	660-080
【주소】	경상남도 진주시 이현동 우신파크맨션 1308호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍연희
【성명의 영문표기】 HONG, Yeon Hee
【주민등록번호】 770817-2923114
【우편번호】 660-080
【주소】 경상남도 진주시 이현동 유신맨션 1동 407호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍성광
【성명의 영문표기】 HONG, Sung Kwang
【주민등록번호】 641217-1930411
【우편번호】 667-911
【주소】 경상남도 하동군 진교면 양포리 산 100번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 강양수
【성명의 영문표기】 KANG, Yang Su
【주민등록번호】 571101-1889812
【우편번호】 660-330
【주소】 경상남도 진주시 하대동 654-2 대영아파트 102동 1209호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 하영주
【성명의 영문표기】 HA, Young Joo
【주민등록번호】 570903-1917112
【우편번호】 664-910
【주소】 경상남도 사천시 곤양면 금정리 산 18번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 노정만
【성명의 영문표기】 ROU, Jeong Man
【주민등록번호】 611121-1925713

【우편번호】	676-804
【주소】	경상남도 함양군 함양읍 백천리 1463번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	곽석준
【성명의 영문표기】	KWACK, Suk Chun
【주민등록번호】	530216-1845717
【우편번호】	660-778
【주소】	경상남도 진주시 하대2동 101번지 현대아파트 106동 1007호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최인호
【성명의 영문표기】	CHOI, In Ho
【주민등록번호】	640729-1253820
【우편번호】	157-220
【주소】	서울특별시 강서구 방화동 개화아파트 107동 902호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김병우
【성명의 영문표기】	KIM, Byeong Woo
【주민등록번호】	720505-1899319
【우편번호】	627-841
【주소】	경상남도 밀양시 상동면 금산리 147번지
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	5
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	19 면 19,000 원



1020030083651

출력 일자: 2004/1/13

【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	10	항	429,000	원
【합계】	477,000			원

【요약서】

【요약】

본 발명은 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩에 관한 것으로, 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 표지유전자군을 검출하기 위해 이들과 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 고착되어 있는 cDNA 칩을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 상기 cDNA 칩을 이용하여 돼지의 경제형질과 관련된 표지유전자군의 발현 프로파일을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 상기에서 제조된 cDNA 칩은 돼지의 품종별 조직별 유전자 발현의 비교, 유전자 변이 검색, 유전자의 다형성 해석, 질병치료용 신약 개발, 질병 진단 및 종돈개량에 응용될 수 있다.

【색인어】

돼지유전자, DNA 칩, 종돈개량, 표지유전자, 프로브

【명세서】

【발명의 명칭】

돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩{cDNA chip for screening specific genes and analyzing their function in swine}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 표지유전자군을 검출하기 위해 이들과 상보적으로 결합할 수 있는 상기 조직에서 분리한 4434개의 ESTs를 포함하는 프로브가 고착되어 있는 cDNA 칩을 제조하여 돼지유전자의 검색 및 기능분석 그리고 돼지의 종돈개량에 응용하는 기술에 관한 것이다.
- <2> 우리나라의 양돈농가의 고부가가치의 창출과 외화의 획득차원에서, 또한, 사료와 종돈을 외국에 의존하는 국내 양돈산업의 경쟁력 제고에 크게 기여하기 위해서, 품질이 우수한 돼지 품종의 개량은 필수적인 과제라 아니할 수 없다. 이러한 과제의 일환으로, 본 발명자는 돼지의 육질에 관련된 특이유전자를 검색하고 이를 이용하여 DNA 칩을 제작한 바 있다. 이러한 특이유전자를 이용하여 형질전환 돼지를 생산하여 브랜드화하고 이를 보급함으로써 양돈농가의 고부가가치를 창출하기 위해서는, 돼지유전자의 기능 분석은 필수 단계인 것이다.
- <3> 지난 수년간 돼지유전자의 연관지도 및 물리적지도에 관한 연구는 주목할 만큼 발전해 왔다. 돼지의 유전자지도 작성 프로젝트(PiGMap Project)는 유럽에서 처음 시작되어 현재 18곳

의 유럽연구소와 미국, 일본, 호주의 7개 연구소가 공동으로 참여하고 있다. 현재까지 돼지의 게놈 맵핑은 마커와 유전자가 결합된 약 1,800개의 마커를 확보하여 돼지의 연관지도를 작성하고 있다(Archibald, 1994; Marklund 등, 1996; Rohrer 등, 1996). 물리적 유전자지도는 실제 600여개의 유전자지도를 작성했다. 여러 개의 양적형질 유전자좌위(QTL, quantitative trait loci)와 후보유전자의 위치를 염색체상에서 발견했고 또한 돼지에서 주요 경제형질과 연관된 주요유전자를 발굴했다. 성장 및 등지방과 관련한 유전자는 염색체 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14에 존재하고, 육질과 관련한 형질의 유전자는 염색체 2, 3, 4, 6, 7, 12, 15에 있으며, 번식형질의 유전자는 염색체 4, 6, 7, 8에 존재하고 있다. 산자수와 관련된 후보유전자, ESR과 PRLR, 질병에 대한 저항성 유전자 FUT1, SLA, NRAMP, 그리고 모색유전자 KIT와 MSHR도 발견되었다.

<4> 주요 형질에 대해 구체적으로 살펴보자면, 성장과 관련된 유전자의 경우, 야생돼지와 라지화이트의 3세대 동안의 가계를 이용하여 4번 염색체에 있는 등지방 두께와 복부지방의 표현형 분산의 20%를 설명하는 주요 QTL 유전자를 발굴하였다. 성장과 관련한 QTL은 13번 염색체에서 발견되었는데 표현형 변이의 7~12%를 설명하고 있다. 후보유전자 분석을 통하여 PRT1 유전자는 등지방과 생시체중과 연관성있는 것으로 밝혀졌고, 이 유전자가 13번 염색체 중앙에 있는 것으로 앤덜슨 등에 의하여 밝혀졌다. 돼지의 MHC의 유전자는 7번 염색체 상에 위치한다. 지난 수년 간 MHC 배수체와 여러 형질들 사이의 연관성이 보고 되었다. 이런 보고는 부분적으로

MHC 군의 DNA 탐침인자에 의해 밝혀졌고 최근에는 중국 돼지의 교잡에 의해서 성장과 등지방형질에 관여하는 QTL 좌위가 7번 염색체에서 발견되었다. 등지방과 생시체중의 QTL 좌위는 TNFA와 S0102의 가까운 곳에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 현재까지의 전체적 결과로 볼 때 적어도 한 개의 성장 및 등지방 QTL 좌위가 이 지역에 존재하는 것으로 나타났다. 또 다른 결과는 6번 염색체에서 성장형질 QTL좌위가 보고 되었지만 악성고열(hyperthermia)을 유발하는 RYR1 유전자에 의해 야기되는 효과와 연관성 있는 것으로 보이고 혹은 RYR1 주위에 있는 알려지지 않은 다른 유전자들과도 연관성이 있는 것으로 보인다. 3번, 6번, 8번, 14번, 염색체에서도 이와 유사한 연관성이 보고된 바 있다. 추가적으로 Gerbens와 Tepas의 보고에 따르면 심장내의 지방산 흡착단백질과 주요 유전자 인자가 일당증체와 연관성 있는 것으로 보고하였다. Leptin CCK와 CCKAR를 포함한 다른 후보유전자들의 지도가 작성되어 식욕형질, 비만 및 성장과 연관성이 있는 것으로 예측된다.

<5> 다음으로, 육질형질과 관련하여, 물돼지(PSE)는 6번 염색체에 있는 RYR1에 의해 야기되는 것으로 보고 되어왔다. 이 결과는 피에트린 돼지에서 유래한 F2 집단에서 물돼지(PSE)와 관련한 여러 육질 형질들과 연관성이 있는 것으로 나타났다. 햄프샤 또한 육질에 있어서 높은 글리코젠 함량과 낮은 산도와 연관성있는 RN유전자에 대한 연구의 관심이 집중되고 있다. RN유전자는 현재 15번 염색체상에서 작성되어 왔고 양쪽의 표지인자들 사이에 존재한다. 앤더슨과 그의 동료들에 따르면 F2 191마리에서 234개의 표지 인자를 이용하여 육질에 관한 가장 완벽한 QTL 좌위를 지도 작성하였다. 여러 육질형질(PH, 보수력, 색소)들에 관한 QTL좌위가 2번, 12번

염색체에 존재하는 것으로 발견되었다. 로스 차일드와 그의 동료들은 육색과 육질의 단단한 점수(firm score)가 4번, 7번 염색체와 연관성이 있는 것으로 보고하였다. 육질형질들에 관한 추가적인 연관성이 7번 염색체에 있는 것으로 보고되었고 또한 근섬유의 수는 3번 염색체와 연관성이 있는 것으로 보고되었다. 말린(malic) 효소의 작용과 관련이 있는 리포제 및 효소는 7번 염색체에 있는 SLA의 복합체와 관련이 있는 것으로 판명되었다. 또한 SLA 복합체 지역에 있는 수태지의 감염과 연관성이 있는 Androstenone 호르몬 수준과 관련된 주요 QTL 좌위가 발견되었다. 근육질에 관한 후보 유전자들 가운데서 HABP 유전자는 근내 지방과 연관성이 있는 것으로 보인다. 마이오지닌에 관하여도 많은 유전자들이 밝혀졌다.

<6> 다음으로, 번식 형질의 경우, 이에 대한 정보를 얻기 위한 시간과 어려움 그리고 많은 가계의 필요성 때문에 번식 형질에 대한 QTL 좌위의 탐색은 상당히 제한적이다. Wilkie 등의 보고에 따르면 비록 서로 다른 염색체에 존재하지만 난소길리와 배란율에 대한 QTL좌위를 보고한 바 있다. Rathje 등의 보고에 따르면 8번 염색체에 배란율이 관련하는 QTL 좌위가 발견되었지만 Wilkie와 동료 연구자에 의하면 배란율에 관여하는 QTL에 의한 보고는 그들의 결과와 약간의 차이가 있었다. 프랑스의 Milan등의 실험에 의하면 산자수 1두를 증가시키는 QTL좌위를 Rathje의 결과와 마찬가지로 8번 염색체에서 발견하였다. 8번 염색체의 다배란과 관련한 QTL 좌위는 상당히 흥미로운 사실이며 이는 면양의 Booroola 유전자와도 같은 지역에 있기 때문이다. 흥미롭게도, Short등의 상업돈군에서 이 유전자좌위가 산자수에 효과가 있는 것으로 밝혀냈다. 4, 6, 7, 13, 15번 염색체등에서도 번식형질과 관련한

QTL분석이 제한적으로 연구중에 있다. 에스트로젠 유전자는 산자수와 대단히 밀접한 관계가 있는 것으로 명확히 밝혀졌다. 유전자의 효과는 품종마다 차이가 있는데 라지화이트중에서는 산자당 0.42두 증가를 보이고 메산돈에서는 산자당 1.15두 증가를 보인다. 좀 더 최근의 결과에 의하면 프로락틴 수용체 좌위가 산자수와 유의한 연관성이 있는 것으로 밝혀졌다.

<7> 마지막으로, 질병의 저항성 및 면역반응형질에 있어서 현재까지 질병의 저항성 또는 면역반응에 관여하는 QTL의 발굴은 상당히 제한적이다. 면역과 관련한 QTL이 일부 발견되었으며, 스트레스와 면역반응과 관련성이 있는 코르티솔에 대한 QTL은 7번염색체 말단에 있는 것으로 밝혀졌다. 돼지의 6번 염색체에 있는 두 개의 알파유전자 FUT1과 FUT2의 위치는 밝혀졌다. Vgeli와 동료연구자들은 라지화이트, 랜드레이스, 햄프샤, 듀록, 피에트란, 돼지들에서 ECF18R 유전자와 대단히 가까이 연관되어 있는 다형 현상을 보이는 표지인자를 발표하였는데 이것은 이러한 품종들에서 대장균F18 접착 진행동물의 MAS를 위한 유용한 표지인자가 될 것이다. 최근에 7번염색체에 있는 SLA 복합체는 나선형선모충(*Trichinella spiralis*)의 감염에 대한 저항성이 있는 것으로 보고되었으나 주혈원충병에 대한 저항성은 없는 것으로 보고되었다. 최근에 쥐에서 살모넬라에 대한 저항성과 연관성이 있는 것으로 밝혀진 NARAMP1유전자는 돼지의 15번 염색체에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 돼지에서도 밝혀진 바 있는 인간의 질병과 관련한 유전자로서 혈액응고인자 IX와 고수준의 콜레스테롤관련 유전자 같은 것들이 있다.

<8> 상기로부터 본 발명자는 종돈의 경제형질의 유전적 개량 즉, 성장능력, 육질, 질병저항성 및 번식능력이 뛰어난 종돈 개량을 목적으로 이와 관련한 후보유전자들을 찾고자하는 노력을 기울여 왔다.

<9> 종래에는 돼지에 존재하는 유전적 차이를 시험하기 위해 노던 블랏팅, 디퍼렌셜 디스플레이, 유전자 발현의 순차적 분석 및 닷 블랏 분석과 같은 mRNA 수준에서 유전자 발현을 분석

하는 몇몇 기술들이 사용되었지만, 이들 방법들은 다수의 발현 산물들을 동시에 분석하는데 있어서는 부적절한 단점을 가지고 있었다. 최근에 이러한 단점들을 보완하기 위해 cDNA 마이크로어레이와 같은 신기술이 개발되었다. cDNA 마이크로어레이는 많은 생물들에서 유전자 발현을 연구함에 있어 가장 강력한 수단이 되고 있다. 이 기술은 유전적 다형성(polymorphism) 스크리닝과 유전체 DNA 클론의 맵핑 뿐만 아니라 수많은 유전자들의 동시 발현과 대규모의 유전자 발현에 적용되었다. 이미 알려져 있는 유전자나 혹은 미확인의 유전자들로부터 전사된 RNA를 정량적으로 분석하는 고도의 RNA 발현 분석 기술인 것이다. 이러한 마이크로어레이는 DNA 칩을 제작하여 사용하는 방법으로서, 유전자 칩은 검출용 뉴클레오티드에 따라 cDNA(200-500 bp) 칩과 올리고뉴클레오티드(15-100 bp) 칩으로 나눌 수 있다. 또한, 제작방법에 따라 핀마이크로어레이나 잉크젯 등의 로봇 프린팅 칩과 반도체 제작 공정을 이용한 광식각 칩으로 나눌 수 있다. cDNA 칩은 말 그대로 오픈 리딩 프레임(Open Reading Frames) 혹은 EST(Expression Sequence Tags)의 전 염기서열을 슬라이드에 부착시킴으로서 상보서열을 소유한 해당 유전자를 고유하게 식별한다.

- <10> 따라서, 본 발명의 목적은 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 표지유전자군을 검출하기 위해 이들과 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 고착되어 있는 cDNA 칩을 제조하여 돼지유전자의 검색 및 기능분석 뿐만 아니라 돼지의 종돈개량에 응용하고자 한다.
- <11> 본 발명의 다른 목적은 돼지의 경제형질과 관련된 표지유전자군의 발현 프로파일을 제공하고자 한다.
- <12> 본 발명의 또 다른 목적은 상기에서 제조된 cDNA 칩을 이용하여 돼지 품종별 조직별 유전자 발현의 비교, 유전자 변이 검색, 유전자의 다형성 해석, 질병치료용 신약 개발 및 질병 진단을 위한 기반을 마련하는 데 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<13> 본 발명의 상기 목적은 프로브 DNA를 제조하기 위해 돼지의 근육과 지방 조직에서 총 RNA를 추출하고 이로부터 cDNA를 제조하고, 이중 4434개의 ESTs를 클로닝하여 염기서열을 데이터베이스에서 분석 및 검색하고 PCR를 통해 상기 ESTs를 증폭한 후 분리 정제하고 DNA 칩 어레이를 이용하여 300개의 효모 대조군과 함께 슬라이드 상에 고착(스팟팅)시켜 DNA 칩을 제조한 다음, 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이하게 발현되는 유전자의 발현 양상을 알기 위해, 가 고시마 버크셔종의 근육 및 지방 조직에서 분리한 총 RNA에 형광물질을 결합시켜 제조한 표적 DNA를 상기 프로브 DNA와 혼성화시켜 이를 스캐닝하고 이미지 파일을 분석한 다음, 근육 및 지방 조직에서 특이하게 발현하는 유전자의 프로파일을 조사함으로써 달성하였다.

<14> 이하, 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

【발명의 구성 및 작용】

<15> 본 발명은 돼지의 근육과 지방 조직에서 ESTs의 확보 및 염기서열 정보 확인단계; 상기 ESTs를 PCR을 통해 증폭 후 분리정제단계; DNA 칩 어레이를 이용하여 슬라이드 상에 상기 ESTs를 고착시켜 DNA 칩을 제조하는 단계; 돼지의 근육과 지방 조직에서 분리한 총 RNA에 형광물질이 결합된 표적 DNA(ESTs)와 상기 프로브 DNA의 혼성화, 스캐닝 및 이미지 파일 분석단계; 및, 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자의 발현 프로파일 조사 단계로 구성된다.

<16> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩은 하기의 단계로 제조된다:

<17> 돼지의 근육과 지방 조직에서 분리한 총 RNA로부터 cDNA를 제작하고,

<18> 이중 4434개의 ESTs를 클로닝하여 염기서열을 데이터베이스에서 분석 및 검색하고,

- <19> PCR를 통해 상기 ESTs를 증폭한 후 분리 정제하고,
- <20> DNA 칩 어레이를 이용하여 이들 4434개의 ESTs를 슬라이드 상에 스팟팅하여 DNA 칩을 제조함.
- <21> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩은 표지 유전자의 cDNA 또는 RNA와 상보적으로 결합할 수 있는 프로브 및 상기 프로브가 고정된 기질을 포함한다.
- <22> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA는 돼지의 근육 및 지방 조직에서 분리한 4434개의 ESTs를 포함함을 특징으로 한다.
- <23> 상기 기질은 실리콘 웨이퍼, 유리, 폴리카보네이트, 멤브레인, 폴리스틸렌 또는 폴리에탄과 같은 고분자 필름이 바람직하다. 본 발명 DNA 마이크로어레이는 통상의 DNA 마이크로어레이 제조방법으로 프로브를 기질에 고정시켜 제조할 수 있으며, 포토리소그래피방법, 압전인쇄방법, 마이크로 피펫팅, 스팟팅 등의 방법을 사용할 수 있으며, 본 발명은 스팟팅 방법을 사용하였다.
- <24> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 세포의 구조와 이동과 관련된 1-알파 디네인 헤비 체인(1-alpha dynein heavy chain), 유사 19 kDa-인터랙팅 단백질 3(19 kDa-interacting protein 3-like), 액틴(Actin), 액틴 알파 1(Actin alpha 1), 액틴 감마 2(Actin gamma 2), 아넥신 A2(Annexin A2), 아넥신 V(Annexin V), 아넥신 II(Annexin II), 베타-미오신 헤비 체인 mRNA(Beta-myosin heavy chain mRNA), 칼페인 라지 폴리펩타이드 L2(Calpain large polypeptide L2), 콜라겐(Collagen), 콜라겐 알파 1(Collagen alpha 1), 콜

라젠 알파 2(Collagen alpha 2), 콜라젠 알파 V(Collagen alpha V), 초파리 디스크 라지 호몰로그 5(Discs, large(Drosophila) homolog 5), 피브로넥틴(Fibronectin), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 2(Heparan sulfate proteoglycan 2), 라민 A/C(Lamin A/C), 미오신(Myosin), 미오신 헤비 체인(Myosin heavy chain), 미오투블라린 관련 단백질 4(Myotubularin related protein 4), 프로콜라젠-프롤린(Procollagen-proline), 산성 분비단백질(Secreted protein acidic), 트로포미오신(Tropomyosin), 트로포미오신 알파 체인(Tropomyosin alpha chain), 트로포닌 C(Troponin C), 튜블린 베타 체인(Tubulin beta chain) 및 비멘틴(Vimentin)을 포함함을 특징으로 한다.

<25> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 대사와 관련된 알돌라아제 A(Aldolase A), 카보네이트 디하이드라타아제(Carbonate dehydratase), 사이토크롬 C(Cytochrome C), 사이토크롬 C 옥시다아제 서브유닛 I(Cytochrome c oxidase subunit I), 사이토크롬 C 옥사다아제(Cytochrome-c oxidase), 프룩토오즈-1,6-비스포스파타아제(Fructose-1,6-bisphosphatase), L-락테이트 디하이드로게나아제 M 체인(L-lactate dehydrogenase M chain), LIM 도메인 1 단백질(LIM domains 1 protein), NADH 디하이드로게나아제(NADH dehydrogenase), NADH-유비퀴논 옥시도리덕타아제 체인 1((NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1), NADH4L, 옥타노일트랜스퍼라아제(Octanoyltransferase, COT), 포스포아르기닌 포스파타아제(Phosphoarginine phosphatase), 포스포글루코뮤타아제 이소폼 2 mRNA(Phosphoglucosmutase isoform 2 mRNA), 프로테인-티로신 키나아제(Protein-tyrosine kinase), 피루베이트 키나아제(Pyruvate kinase), 사콜리핀(Sarcosine), 티로신 포스파타아제 타입 IVA(Tyrosine phosphatase type IVA), UDP 글루코우즈 파이로포스포릴라아제(UDP glucose pyrophosphorylase), 글리코젠 포스포릴라아제

b(Glycogen phosphorylase b) 및 슈퍼록사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase)를 포함함을 특징으로 한다.

<26> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 유전자 및 단백질 발현과 관련된 일통게이션 팩터 1 알파(Elongation factor 1 alpha), 일통게이션 팩터 1 알파 1(Elongation factor 1 alpha 1), 에놀라아제 3(Enolase 3), 리피터티브 DNA 시퀀스 엘리먼트 RPE-1(Repetitive DNA sequence element RPE-1), 소포체 단백질(Reticulum protein), 리보뉴클레오프로테인 폴리펩타이드 B(Ribonucleoprotein polypeptide B), 리보솜 단백질(Ribosomal protein), 리보솜 단백질 L18a(Ribosomal protein L18a), 리보솜 단백질 P0(Ribosomal protein P0), 트랜스퍼 RNA-Trp 신세타아제(Transfer RNA-Trp synthetase), 전사개시인자 eif1(Translation initiation factor eif1), LIM 도메인 1 단백질(LIM domains 1 protein) 및 메탈로프로티나아제 3의 조직 저해제(Tissue inhibitor of metalloproteinase 3)를 포함함을 특징으로 한다.

<27> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 세포 신호전달/교환 관련된 미토콘드리아 DNA(Complete mitochondrial DNA), 미토콘드리온(Mitochondrion), 포타슘 채널(Potassium channel) 및 크레아틴 키나아제 유사 유전자(Similar to creatine kinase)를 포함함을 특징으로 한다.

<28> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 DNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 세포분열과 관련된 프로테아제(Protease) 및 시스테인 1(cystein 1)을 포함함을 특징으로 한다.

- <29> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 면역반응과 관련된 인터루킨-2 리셉터 알파 체인(Interleukin-2 receptor alpha chain), 켈 유사 단백질 23(Kel-like protein 23) 및 MHC 클래스 I SLA 유전체 부위(MHC class I SLA genomic region)를 포함함을 특징으로 한다.
- <30> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 DNA 마이크로어레이 상에 고착되는 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 성장과 관련된 서열목록 서열 1 내지 5에 기재된 성장인자 I, II, III, IV 및 V의 염기서열을 포함함을 특징으로 한다.
- <31> 본 발명은 상기 cDNA 칩, Cy5-dCTP 또는 Cy3-dCTP과 결합시킨 검색 조직의 RNA에서 얻은 cDNA, 형광스캐닝시스템 및 컴퓨터분석시스템으로 구성된 돼지유전자 검색 및 기능분석용 키트를 제공한다.
- <32> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩을 이용한 특이 유전자 발현 프로파일 측정방법은 특정세포에서 발현되는 표지유전자를 분석하여 돼지의 육질을 진단할 수 있고, 탐지된 돼지의 성장관련특이유전자를 이용하여 성장능력이 향상된 종돈 개량에 이용될 수 있으며, 세포의 일반 대사 및 질병저항에 대한 면역반응에 관련된 유전자의 프로파일을 확인함으로써 돼지의 질병 진단 및 치료약 개발에 사용될 수 있다.
- <33> 이하, 본 발명의 구체적인 구성을 실시예를 통해 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- <34> [실시예]
- <35> 실시예 1 : 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩의 제작

<36> 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩을 제작하기 위해, 가고시마 버크셔종의 근육과 지방 조직에 분리한 총 RNA를 PCR을 통해 4434개의 ESTs를 얻고 이를 클로닝하여 염기서열을 데이터베이스에서 분석 및 검색하고 PCR을 통해 상기 ESTs를 증폭한 후 분리 정제하고 DNA 칩 어레이를 이용하여 슬라이드 상에 고착시켜 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩을 제작하였다. 그 후, 돼지 근육 및 지방 조직에서 총 RNA를 분리하고 상기 cDNA 칩을 이용하여 돼지유전자의 발현 프로파일을 검색하였다.

<37> 제조예 1: 프로브 DNA의 제조 및 어레이

<38> 우선, 슬라이드글라스에 부착하기 위해 PCR에 의해 증폭된 cDNA인 프로브 DNA를 제작하였다. 가고시마 버크셔종(체중이 30 kg 및 90 kg인 것을 선택함)의 등심부위의 근육 및 지방조직에서 RNA 분리 키트(독일 퀴아젠사)를 사용하여 메뉴얼에 따라 총 RNA를 분리하고 oligo(dT) column을 이용하여 mRNA를 분리하였다. 상기 에서 분리한 mRNA 시료에 SP6, T3 정방향 프라이머, T7 역방향 프라이머(영국 아머삼 파마시아 바이오테크)를 사용하여 RT-PCR을 실시하고 cDNA를 합성하였다. 각 PCR 반응물의 총 부피는 100 μ l로 하였다. 100 pM의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머 각각을 96-웰 PCR 플레이트(영국 제네틱스)에 옮겼다. 각 웰에는 2.5 mM dNTP, 10 \times PCR 버퍼, 25 mM MgCl₂, 0.2 μ g의 DNA 주형, 2.5 유닛의 Taq 폴리머라아제가 포함되게 하였다. PCR은 GeneAmp PCR 시스템 5700(캐나다 AB 어플라이드 바이오시스템)에서 다음의 조건 하에서 실시하였다: 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 총 30 사이클.

<39> 증폭된 DNA의 크기는 아가로우즈 젤 전기영동에서 확인하였다. PCR 산물을 96-웰 플레이트에서 에탄올 침전을 실시한 후 건조시켜 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

<40> 상기에서 준비된 총 4434개의 cDNA(ESTs)를 클로닝하여 돼지가 가지고 있는 유전자의 염기서열을 분석하고, 이들의 정보는 NCBI를 통해 알아내었다. 정보를 가진 유전자들을 다시 PCR을 통해 분리정제한 다음, 총 4434개의 cDNA(ESTs)가 놓여질 자리와 배치도를 만든 후, 총 4434개의 cDNA(ESTs)와 300개의 효모 대조군을 1.7 cm² 면적에 배열하였다. 그 후, 마이크로그리드 II(바이오로보틱스)를 이용하여 CMT-GAPSTM 아미노실레인(aminosilane)이 코팅된 현미경용 슬라이드글라스(코닝사 제품)에 프로브 DNA를 점적하였다. 스포릿 핀을 이용하여 마이크로그리드 II(MicroGrid II)로 프로브 DNA를 프린트하였다. 그 후 핀 장치를 마이크로플레이트 내웰에 접근시켜 상기 용액을 슬라이드글라스에 주입하였다(1~2 nL). 프로브 DNA를 프린팅한 후, 슬라이드를 건조시키고, 점적시킨 DNA와 슬라이드를 스트라타링커™(미국 스트라타진)을 이용하여 90 mJ에서 UV-크로스링킹으로 결합시키고, 실온에서 2분 동안 0.2% SDS로 두 번 세척하고, 실온에서 2분 동안 3차 증류수로 한번 세척하였다. 세척 후, 슬라이드를 95℃ 수조에 2분 동안 침지시키고, 억제제(blocking solution, pH7.4의 인산염 완충액 300 mL에 1.0 g NaBH₄를 녹인 용액과 무수 에탄올 100 mL를 혼합한 용액)를 첨가하여 15분 동안 차단하였다. 그 후, 상기 슬라이드를 실온에서 1분 동안 0.2% SDS로 3번 세척하고, 실온에서 2분 동안 3차 증류수로 한번 세척하고, 대기 중에서 건조시켰다.

<41> 상기 돼지 근육 및 지방 조직에서 얻은 프로브 DNA로부터 검출될 수 있는 표지유전자군은 다음을 포함하고 있다:

<42> 1) 세포의 구조와 이동과 관련된 유전자 군:

<43> 1-알파 디네인 헤비 체인(1-alpha dynein heavy chain), 유사 19 kDa-인터랙팅 단백질(19 kDa-interacting protein 3-like), 액틴(Actin), 액틴 알파 1(Actin alpha 1), 액틴 감마 2(Actin gamma 2), 아넥신 A2(Annexin A2), 아넥신 V(Annexin V), 아넥신 II(Annexin II),

베타-미오신 헤비 체인 mRNA(Beta-myosin heavy chain mRNA), 칼페인 라지 폴리펩타이드 L2(Calpain large polypeptide L2), 콜라겐(Collagen), 콜라겐 알파 1(Collagen alpha 1), 콜라겐 알파 2(Collagen alpha 2), 콜라겐 알파 V(Collagen alpha V), 초파리 디스크 라지 호몰로그 5(Discs, large(Drosophila) homolog 5), 피브로넥틴(Fibronectin), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 2(Heparan sulfate proteoglycan 2), 라민 A/C(Lamin A/C), 미오신(Myosin), 미오신 헤비 체인(Myosin heavy chain), 미오튜블라린 관련 단백질 4(Myotubularin related protein 4), 프로콜라겐-프롤린(Procollagen-proline), 산성 분비단백질(Secreted protein acidic), 트로포미오신(Tropomyosin), 트로포미오신 알파 체인(Tropomyosin alpha chain), 트로포닌 C(Troponin C), 튜블린 베타 체인(Tubulin beta chain) 및 비멘틴(Vimentin).

<44> 2) 대사와 관련된 유전자군:

<45> 알돌라아제 A(Aldolase A), 카보네이트 디하이드라타아제(Carbonate dehydratase), 사이토크롬 C(Cytochrome C), 사이토크롬 C 옥시다아제 서브유닛 I(Cytochrome c oxidase subunit I), 사이토크롬 C 옥사다아제(Cytochrome-c oxidase), 프룩토오즈-1,6-비스포스파타아제(Fructose-1,6-bisphosphatase), L-락테이트 디하이드로게나아제 M 체인(L-lactate dehydrogenase M chain), LIM 도메인 1 단백질(LIM domains 1 protein), NADH 디하이드로게나아제(NADH dehydrogenase), NADH-유비퀴논 옥시도리덕타아제 체인 1((NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1), NADH4L, 옥타노일트랜스퍼라아제(Octanoyltransferase, COT), 포스포아르기닌 포스파타아제(Phosphoarginine phosphatase), 포스포글루코뮤타아제 이소폼 2 mRNA(Phosphoglucomutase isoform 2 mRNA), 단백질-티로신 키나아제(Protein-tyrosine kinase), 피루베이트 키나아제(Pyruvate kinase), 사콜리핀(Sarcosine), 티로신 포스파타아제 타입 IVA(Tyrosine phosphatase type IVA), UDP 글루코우즈 피로포스포릴라아제(UDP glucose

pyrophosphorylase), 글리코겐 포스포릴라아제 b(Glycogen phosphorylase b) 및 슈퍼록사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase).

<46> 3) 유전자/ 단백질 발현 관련 유전자군:

<47> 일롱게이션 팩터 1 알파(Elongation factor 1 alpha), 일롱게이션 팩터 1 알파 1(Elongation factor 1 alpha 1), 에놀라아제 3(Enolase 3), 리피터티브 DNA 시퀀스 엘리먼트 RPE-1(Repetitive dna sequence element RPE-1), 소포체 단백질(Reticulum protein), 리보뉴클레오프로테인 폴리펩타이드 B(Ribonucleoprotein polypeptide B), 리보솜 단백질(Ribosomal protein), 리보솜 단백질 L18a(Ribosomal protein L18a), 리보솜 단백질 P0(Ribosomal protein P0), 트랜스퍼 RNA-Trp 신세타아제(Transfer RNA-Trp synthetase), 전사개시인자 eif1(Translation initiation factor eif1), LTM 도메인 1 단백질(LIM domains 1 protein) 및 메탈로프로티나아제 3의 조직 저해제(Tissue inhibitor of metalloproteinase 3).

<48> 4) 세포 신호전달/교환 관련 유전자군:

<49> 미토콘드리아 DNA(Complete mitochondrial DNA), 미토콘드리온(Mitochondrion), 포타슘 채널(Potassium channel) 및 크레아틴 키나아제 유사 유전자(Similar to creatine kinase).

<50> 5) 세포분열 관련 유전자군:

<51> 프로테아제(Protease), 시스테인 1(Cystein 1).

<52> 6) 면역반응 관련 유전자군:

<53> 인터루킨-2 리셉터 알파 체인(Interleukin-2 receptor alpha chain), 켈 유사 단백질 23(Kel-like protein 23) 및 MHC 클래스 I SLA 유전체 부위(MHC class I SLA genomic region).

<54> 7) 성장 관련 유전자군:

<55> 성장인자 I, II, III, IV 및 V로써 서열목록 서열 1~5에 기재함.

<56> 8) 기타:

<57> cDNA flj13323 fis, KIAA0182 protein, KIAA1096 protein, AC015998, AR078G01iTHYEG01S, Cn26h08.x1, COI, DJ466P17.1.1(Laforin), Foocen-m, HWM012cA.1, Hypothetical protein, Hypothetical protein, Hypothetical protein, Hypothetical protein, Mandarin library, MARC 1PI, MARC 2PIG, MR1-AN0039-290800-004-a01, NIH_MGC_4, NIH_MGC_65, NIH_MGC_77, NIH_MGC_77, Peripheral Blood Cell cDNA library, Putative, Reinhardtii CC-1690, Small intestine cDNA library, Thymosin beta-4 mRNA, Unknown, Unnamed protein product, Chromosome 14 DNA sequence, Integrin beta-1 subunit, Reinhardtii CC-1690.

<58> 실험예 1: 본 발명 cDNA 칩을 이용한 조직특이유전자의 발현 프로파일 검색

<59> 상기 실시예 1에서 제조된 cDNA 칩을 이용하여 돼지의 근육 및 지방조직에서 특이적 발현되는 유전자의 발현 프로파일을 조사하였다. 검색 시료로서 체중 30 kg 및 90 kg의 가고시마 버크셔종(Kagoshima Berkshire)에서 등심부위(longissimus dorsi) 근육조직을 채취하였다. 지방 조직은 체중 30 kg의 가고시마 버크셔종에서 얻었다. 근육과 지방조직을 5-8 mm 길이로 자른 다음 액체질소로 냉동시켜 -70℃에서 보관하였다.

<60> 표적 DNA를 제조하기 위해 트리졸™ 키트(라이프 테크놀로지) 매뉴얼에 따라 0.2~1.0 g의 실험군과 대조군 조직에서 총 RNA를 분리하였다. 글래스-테프론 또는 폴리트론 균질기로 조직 50-100 mg 당 1 mL의 트리졸™을 조직 시료에 넣고 파쇄하였다. 4℃에서 12,000 g으로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 1 mL씩 분취(aliquot)하였다. 여기에 200 μ l의 클로로포름을 첨가

하고 15초 동안 볼텍싱하고 15분 동안 얼음에 놓아 둔 후 4℃에서 12,000 g로 10분 동안 원심 분리하였다. 동량의 클로로포름을 첨가하고 15초 동안 볼텍싱한 후 15분 동안 얼음에 놓아두었다. 이를 4℃에서 12,000 g로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 새 튜브로 옮기고 500 μ l의 이소프로판올을 첨가하고 볼텍싱하고 얼음에 15분 동안 놓아두었다. 얼음을 냉각시키고 4℃에서 12,000 g로 5분 동안 원심분리하고 상등액을 분리하고 여기에 75% 냉 에탄올 1 mL을 첨가한 후 4℃에서 12,000 g로 5분 동안 원심분리하였다. 상등액을 취하여 클린벤취에서 30분 동안 얼음에서 건조시킨 다음 RNase가 제거된 물이나 DEPC 물 20 μ l로 RNA를 녹였다. 총 DNA 농도를 40 μ g/17 μ l로 하여 전기영동을 준비하였다.

<61> 표준 펄스트 스트랜드 cDNA 합성법(standard first-strand cDNA)에 따라 표적 DNA를 얻었다. 간단히 말해, Schuler(1996)의 방법에 따라, 총 RNA 40 μ g과 올리고 dT-18mer 프라이머(인비트로젠 라이프 테크놀로지)를 혼합하고 이를 65℃에서 10분 동안 가열한 후 4℃에서 5분간 냉각하였다. 그 후, 1 μ l의 25 mM dATP, dGTP 및 dTTP 혼합액, 1 μ l의 1 mM dCTP(프로메가) 및 2 μ l의 1 mM 시아닌 3-dCTP 혹은 2 μ l의 1 mM 시아닌 5-dCTP, 20 units의 RNase 저해제(인비트로젠 라이프 테크놀로지), 100 units의 M-MLV RTase, 2 μ l의 10 \times 펄스트 스트랜드 완충액을 첨가한 후 피펫을 이용하여 혼합하였다. 반응혼합액을 38℃에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 에탄올 침전에 따라 미결합 상태의 뉴클레오티드를 제거하였다. 이때 사용한 물은 DEPC 처리된 살균수를 사용하였다.

<62> 상기에서 제조한 슬라이드에 혼성화 용액(5 \times SSC, 0.2% SDS, 1 mg/mL 청어 정자 DNA)으로 65℃에서 1시간 동안 미리 혼성화(prehybridization)시켰다. 시아닌 3(Cy-3)와 시아닌 5(Cy-5)로 표지된 표적 DNA는 20 μ l의 혼성화 용액으로 재현탁하고 95℃에서 2분 동안 변성시

켰다. 그 후, 슬라이드와 상기 용액을 65℃에서 밤새도록 혼성화시켰다. 상기 과정은 습윤 챔버에서 커버글라스(그레이스바이오랩)를 덮고 실시하였다.

<63> 혼성화 후, 슬라이드는 2×SSC, 0.1% SDS 혼합액으로 실온에서 5분 동안 댄싱 셰이커 (Dancing shaker)에서 격렬하게 교반하면서 4번 세척하였다. 그 후, 상기 슬라이드를 0.2×SSC로 5분 동안 2번 세척하고, 0.1×SSC로 실온에서 5분 동안 세척하였다.

<64> 상기 슬라이드는 스캔어레이 5000(GSI 루모닉스 버전 3.1)에서 50 μm의 픽셀 사이즈로 스캔하였다. 시아닌 3-dCTP로 표지된 표적 DNA는 565 nm에서 스캔하고, 시아닌 5-dCTP로 표지된 표적 DNA는 670 nm에서 스캔하였다. 2개의 형광강도는 시아닌 3-dCTP, 시아닌 5-dCTP로 표지된 스팟의 선 스캐닝에 따라 표준화하였다. 다시 상기 슬라이드를 스캔어레이 4000XL에서 10 μm의 픽셀 사이즈로 스캔하였다. 이로부터 얻은 TIFF 이미지 화일을 퀀트어레이 소프트웨어 버전 2.1(Quantarray software version 2.1)에서 분석하고, 배경을 자동제거하였다. 각 스팟의 강도는 퀀트어레이에서 마이크로소프트 엑셀로 변환하였다.

<65> 돼지의 근육 및 지방조직에서 미성숙기에서 발현되는 근육유전자(ESM, early stage muscle)의 전체적인 발현 패턴을 성숙기에서 발현되는 근육유전자(ASM, adult stage muscle)와 미성숙기 지방유전자(ESF, early stage fat)의 것과 비교하였다. "ESM-특이" 및 "ASM-특이" 유전자는 표 1에 나타내었고, "ESF-특이" 유전자는 표 2에 나타내었다. 20개의 유전자가 ESM에서 보다는 ASM에서 5배 이상 높은 발현을 나타내었다. 또한, 18개의 유전자는 ESM에서 보다는 ESF에서 5 내지 10배 높은 발현을 나타내었다. 또한, ASM에서 보다는 ESM에서 5 내지 10배 높은 발현을 나타내었다.

<66> 또한, 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이하게 발현되는 하기 5개의 신규한 성장특이유전자를 밝혀내었다.

<67> 1) GF(growth factor) I gene

<68>

```

gagaccagca aatactatgt gaccatcatt gatgcccag gacacagaga cttcatcaa      60
acatgatta caggcacatc ccaggctgac tgtgctgtcc tgattgttgc tgcctggtgtt    120
ggtgaatttg aagctggtat ctocaagac gggcagacc ggcagcatgc tcttctggct    180
tacacoctgg gtgtgaaca gctgattgtt ggtgtcaaca aatggattc cacagagca      240
ccatacagtc agagagata caggaatc gttaaggag tcagcaocta cattaagaa      300
attggtaca accctgacac agtagcattt gtgcaattt ctggttggaa tggtagaac      360
atgctggagc caagtgtaa tatgcttgg ttcaaggat ggaagtcac cgcgaagat      420
ggcagtgoa gtggcaccac gctgctggaa gctttggatt gtatcctacc accaactogt    480
ccaactgaca agcctctgog actgcccctc caggatgtct ataaaattgg aggcattggc    540
actgtcoctg tgggocagt ggaactggt gttctcaac ctggcatggt ggttaccttt    600
gctocagtc atgtacaac tgaagtcaag tctgttgaa tgacocatga agctttgagt    660

```

<69> 2) GF(growth factor) II gene

<70>

```

gtgactgat cggagatc agtctatctt aatcacgga gattcggg caggagac      60
tgtgacag aggtgtga tcagtactt tgcacatc ggcgtcctg gggagaga      120
gagggaga cctactctg gcaaatga gggactctg gagatcaga tcatcagtc      180
caacccctg ctgagggt ttggcagc cagacgtg aggaagaca actctctg      240
ctttggtaa ttcatcaga tccacttgg taccctggg agctggctt ctgtgacat      300
cgacatat cttctagga agtctaggc cactttcag ctaggagc agagagta      360
ccacatttt tatcagatc tgtctaca gagccagc ctcatgaa tgcctctgat      420
caccacac ccatalgact agccttctg cgtcaggg ggcacatg toccagat      480
tgatgaca gaggctga tggcacaga tagtgcatt gaatcctg      540

```

<71> 3) GF(growth factor) III gene

<72>

gttgttcctt taatatgat gtggcaca gdtgattgg agatcattg cagtaatt	60
tcaatgigc caactacag agaatactt caagtcttc ttactgatg acacatgag	120
gagtaattc agcagttcat tgatgtcctg aggttagag tcaggaagc tgtcttggt	180
ttactaggg atgaacct gacagcaat gagtttga aagtgiga taggaagca	240
aagtgtgaa tctgttttc tggggcatt gattcatgg ttattgac cctgtgac	300
gtcatattc ctttagatga accaattgat cttctaatg tagtttcat agtgagaa	360
aggcatgc caactactt tacagaga ggaataac agaaataa atgtgaata	420
ccttcagag aattctctaa agatgttgt gctgtgtgt ctgacagtc taataacat	480
tcagtgac agatgac acagaggg ggaactaa ggaactaaa gctgttag	539

<73>

4) GF(growth factor)IVgene

<74>

catttagggggtaggc tggcagc calcatggc ctggctgg gggcgca	60
tctcagc tactgatga agtctcac tggggggc tactctct gacacgt	120
ggggcgca tgggggca calcatggg agtctgt agtggct ggttggc	180
aggggtgg cgggggc ctctctcc tctggaa aggtaga gtcgagc	240
gggagcca tccatggc caggggc ttctgtgc cggaggt ctccagc	300
tcttcagc gtaggggc ggggatt caggaca ctacacag calcatgg	360
tggcatgc acatcaga ggttgtat gacacag tcagtcgg ggcacac	420

<75>

5) GF(growth factor)V gene

<76>

tatatagac agatcaggt acatgggc tgaccagca gggcaaac aggcacct	60
aggggttat aattaggta tagggggt gacacata tactactac cggaggg	120
ggcaactag ggtcggca taggcaccc ttctctggc gtcgatgtg cggctgag	180
ttatagggt gcaacgc atacacct tacagcac ttattaagt acatcaga	240
gggtctgta ccaacctaa gaggggag tggtaggc tgccgtta cctgggag	300
tgttggtgt agtcggcc tagcttcc agatgggc cgtttttac acacatgg	360
ggactagc aagtgggt gaggtag cgtctatgt agagtgg ggaacgg	420
tgtagcagc ttactacatg ttagtttcag caaacct gcaatacc gtgttccta	480
ctcaactct gloggttca ggcag	507

<77> 【표 1】

ESM 과 ASM에서 달리 발현되는 유전자의 발현 비율

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율 ESM(30)/ASM(90)
세포 구조 및 이동상			
SM2149	CAB56598	1-alpha dynein heavy chain	-2.1
SM781	NP_033891	19 kDa-interacting protein 3-like	+2.1
SM635	BAB19361	Actin	+3.4
SM713	AAA51586	Actin	+6.3
SM106	P53506	Actin	+8.8
SM1068	AAF20165	Actin	+5.3
SM363	B25819	Actin	+4.3
SM768	X52815	Actin	+3.4
SMk77	NM_001100	Actin, alpha 1	+15.1
SM128	NP_033740	Actin, gamma 2	+6.9
SM902	BC001748	Annexin A2	-3.2
SM846	P81287	Annexin V	-2.8
SM653	P04272	Annexin II	-2.2
SMk340	U75316	Beta-myosin heavy chain mRNA	+3.0
SM1605	AAF99682	Calpain large polypeptide L2	+4.7
SM541	NP_000079	Collagen	-3.2
SM715	L47641	Collagen	-6.8



1020030083651

출력 일자: 2004/1/13

<78>

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율 ESM(30)/ASM(90)
세포 구조 및 이동상			
SM430	Q9XSJ7	Collagen alpha 1	-6.8
SM758	CGHU1S	Collagen alpha 1	-2.1
SM62	CGHU2V	Collagen alpha 2	-3.2
SM949	O46392	Collagen alpha 2	-3.3
SM410	CAA28454	Collagen(alpha V)	-2.3
SM1651	XM_039583	Discs, large(Drosophila) homolog 5	-2.0
SM1050	AAA30521	Fibronectin	-2.4
SM491	NM_005529	Heparan sulfate proteoglycan 2	-2.2
SM1573	XM_044160	Lamin A/C	+2.6
SMk55	NP_006462	Myosin	+3.9
SMk338	P79293	Myosin heavy chain	+2.0
SMk168	ABO25261	Myosin heavy chain	+9.0
SM1732	NP_004678	Myotubularin related protein 4	+3.8
SM1691	NP_000908	Procollagen-proline	-2.3
SM690	NP_003109	Secreted protein, acidic	-4.4
SMk173	X66274	Tropomyosin	+2.6
SM141	CAA38179	Tropomyosin	+2.7
SMk51	P18342	Tropomyosin alpha chain	+9.6
SM1043	P06469	Tropomyosin alpha chain	+11.5
SMk19	P02587	Troponin C	+14.5
SMk50	Y00760	Troponin-C	+19.6
SMk57	AAA91854	Troponin-C	+14.6
SM1535	P02554	Tubulin beta chain	+2.8
SM1063	P20152	Vimentin	-5.4
대사			
SMk56	AAA37210	Aldolase A	+5.5
SM995	CAA59331	Carbonate dehydratase	+3.2
SMk344	NM_012839	Cytochrome C	+3.4
SM800	AAG53955	Cytochrome c oxidase subunit I	+3.0
SM51	T10974	Cytochrome-c oxidase	+3.8
SMk151	CAA06313	Fructose-1,6-bisphosphatase	+7.1
SM2070	P00339	L-lactate dehydrogenase M chain	+12.7
SMk120	AJ275968	LIM domains 1 protein	+8.6
SMk147	X59418	NADH dehydrogenase	+2.4
SM928	O79874	NADH-ubiquinone oxidoreductase	+5.3
SMk18	AAG28185	chain 1	+2.1
SMk81	O19094	NADH4L	+3.2
SM295	ABO06852	Octanoyltransferase(COT)	+2.6
SMk346	M97664	Phosphoarginine phosphatase	+5.5
SM36	TVMVRR	Phosphoglucosutase isoform 2 mRNA	+4.3
SM887	P11980	Protein-tyrosine kinase	+8.5
SM698	S64635	Pyruvate kinase	+9.7
SM723	P52480	Pyruvate kinase	+7.3
SMk79	U44751	Pyruvate kinase	+5.2
SMk135	Z98820	Pyruvate kinase	+3.0
SM1033	XM_018138	Sarcolipin	+2.9
SMk347	X99312	Tyrosine phosphatase type IVA	+3.0
		UDP glucose pyrophosphorylase	

<79>

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율 ESM(30)/ASM(90)
유전자/단백질 발현			
	U09823	Elongation factor 1 alpha	-4.3
SM75	AAH05660	Elongation factor 1 alpha 1	-3.9
SM1989	NP_031959	Enolase 3	+3.6
SMk61	Y00104	Repetitive dna sequence element	-2.5
SM968	AAC48501	RPE-1	+4.6
SMk91	NP_003083	Reticulum protein	+3.1
SM2083	AAH01127	Ribonucleoprotein polypeptide B	+2.0
SM896	AAH07512	Ribosomal protein	+2.1
SM1668	228176	Ribosomal protein L18a	+6.2
SM1784	AAA30799	Ribosomal protein P0	+6.0
SM1801	51077272	Transfer RNA-Trp synthetase	+3.5
SM997		Translation initiation factor eif1	
세포 신호전달/교환			
	AJ002189	Complete mitochondrial DNA	+3.9
SM464	AF304203	Mitochondrion	+5.9
SM732	XM_006515	Potassium channel	-2.4
SMk11	BC007462	Similar to creatine kinase	+3.5
SMk187			
세포분열			
SM1067	XP_007399	Protease, cystein, 1	+3.1
미확인			
SM1785	AC015998	AC015998	+2.1
SM2152	BI327422	AR078G01iTHYEG01S	-4.0
SM1469	BG938561	Cn26h08.x1	-2.2
SM908	AAG28205	COI	+2.8
SM851	AAG28192	COI	+3.6
SM1738	CAA19420	DJ466P17.1.1(Laforin)	+4.8
SM1007	AAD31021	Foocen-m	+3.8
SM1920	BE421626	HWM012cA.1	+3.3
SM1972	XP_039195	Hypothetical protein	+3.2
SM1536	T08758	Hypothetical protein	+4.7
SMk137	XP_002275	Hypothetical protein	+20.0
SM1724	XP_016035	Hypothetical protein	-2.6
SM1539	AT001097	Mandarina library	-2.3
SM1474	BG384994	MARC 1PI	+2.6
SM1853	BF198401	MARC 2PIG	+3.6
SM1941	BE925069	MR1-AN0039-290800-004-a01	+4.4
SM379	AW328623	NIH_MGC_4	+2.3
SM1911	BE872239	NIH MGC 65	-2.4

<80>

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율
			ESM(30)/ASM(90)
미 확인			
SM1676	BG548727	NIH_MGC_77	+5.1
SM1914	BG534187	NIH_MGC_77	-2.3
SM1650	BI337009	Peripheral Blood Cell cDNA library	+9.3
SM1064	BAB28119	Putative	+3.4
SM618	BAB28422	Putative	+2.1
SM1774	BAB30715	Putative	+3.2
SM1690	BF864360	Reinhardtii CC-1690	+2.2
SM1898	F23148	Small intestine cDNA library	-2.3
SM96	M17733	Thymosin beta-4 mRNA	-4.2
SM1922	AAH03026	Unknown	+4.0
SM210	BAA91923	Unnamed protein product	-3.1
일치하지 않음			
SM107		No match	
SM278		No match	
SM384		No match	
SMk37		No match	
SM717		No match	
SM1598		No match	
SMk6		No match	
SMk68		No match	
SM1100		No match	
SMk70		No match	
SMk80		No match	
SMk112		No match	
SM1639		No match	
SMk148		No match	
SM1665		No match	
SM1665		No match	
SMk95		No match	
SMk133		No match	
SMk152		No match	
SM1897		No match	
SMk138		No match	
SM1902		No match	
SMk342		No match	
SMk181		No match	
SM904		No match	
SMk262		No match	
SM9		No match	
SM1964		No match	
SMk335		No match	

- <81> †: 일치하는 Accession no.
- <82> **: 데이터베이스와 일치하는 정보
- <83> No match: 데이터베이스에서 일치하는 정보가 없음; 신규한 EST
- <84> ESM: early stage muscle(체중 30 kg), ASM: adult stage muscle(체중 90 kg)
- <85> SM: 돼지 근육

<86> 【표 2】

ESM 과 ESF 에서 달리 발현되는 유전자의 발현 비율

ESTs No.	Accession No. +	Description**	유전자발현 비율
			ESF(30)/ESM(30)
세포 구조 및 이동상			
SM2149	CAB56598	1-alpha dynein heavy chain	-2.1
SM781	NP_033891	19 kDa-interacting protein 3-like	+2.2
SM1068	AAF20165	Actin	+4.5
SM635	BAB19361	Actin	+2.6
SM106	P53506	Actin	+4.9
SM768	X52815	Actin	+2.4
SM363	B25819	Actin	+3.7
SM713	AAA51586	Actin	+5.6
SMk77	NM_001100	Actin, alpha 1	+4.5
SM128	NP_033740	Actin, gamma 2	+3.9
SM1091	JC5971	Alpha-b crystallin	+2.1
SM902	BC001748	Annexin A2	-4.2
SM846	P81287	Annexin V	-3.5
SM653	P04272	Annexin II	-2.3
SMk340	U75316	Beta-myosin heavy chain mRNA	+2.2
SM1807	AAF99682	Calpain large polypeptide L2	+2.7
SM541	NP_000079	Collagen	-4.9
SM715	L47641	Collagen	-5.2
SM1023	Q9XSJ7	Collagen alpha 1	-4.6
SM758	CGHU1S	Collagen alpha 1	-4.3
SM62	CGHU2V	Collagen alpha 2	-4.4
SM949	O46392	Collagen alpha 2	-3.2
SM410	CAA28454	Collagen(alpha V)	-2.3
SM1121	NM_000393	Collagen, type V, alpha 2	-2.8
SM53	NP_000384	Collagen, type V, alpha 2	-2.5
SM1651	XM_039583	Discs, large(Drosophila) homolog 5	-8.6
SM1050	AAA30521	Fibronectin	-3.1
SM381	FNHU	Fibronectin precursor	-2.6
SM122	P07589	Fibronectin(FN)	-2.5
SM1573	XM_044160	Lamin A/C	+2.1
SMk55	NP_006462	Myosin	+3.6
SMk168	AB025261	Myosin heavy chain	+5.0
SM1732	NP_004678	Myotubularin related protein 4	+4.7
SM690	NP_003109	Secreted protein, acidic	-5.2
SM1043	P06469	Tropomyosin alpha chain	+8.6
SMk173	X66274	Tropomyosin	+2.2
SMk19	P02587	Troponin C	+6.9
SMk57	AAA91854	Troponin-C	+7.1
SMk50	Y00760	Troponin-C	+9.0
SM1535	P02554	Tubulin beta chain	+3.3
SM1063	P20152	Vimentin	-5.1
SM730	CAA69019	Vimentin	-3.2

<87>

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율 ESF(30)/ESM(30)
대사			
SMk344	NM_012839	Cytochrome C	+2.4
SM800	AAG53955	Cytochrome c oxidase subunit I	+2.9
SMk151	CAA06313	Fructose-1,6-bisphosphatase	+4.2
SMk254	231300	Glycogen Phosphorylase b	+2.6
SM2070	P00339	L-lactate dehydrogenase M chain	+10.6
SM928	079874	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	+3.2
SMk81	019094		+3.9
SM295	AB006852	Octanoyltransferase(COT)	+2.3
SMk346	M97664	Phosphoarginine phosphatase	+3.3
SM36	TVMVRR	Phosphoglucomutase isoform 2 mRNA	+2.6
SM723	P52480	Protein-tyrosine kinase	+7.5
SM698	S64635	Pyruvate kinase	+6.6
SM887	P11980	Pyruvate kinase	+6.3
SM1594	AAA62278	Pyruvate kinase	-3.2
SM1033	XM_018138	Superoxide dismutase	+2.2
		Tyrosine phosphatase type IVA	
유전자/단백질 발현			
SM75	U09823	Elongation factor 1 alpha	-3.7
SM1989	AAH05660	Elongation factor 1 alpha 1	-3.8
SMk120	AJ275968	LIM domains 1 protein	+9.9
SMk91	AAC48501	Reticulum protein	+2.1
SM2083	NP_003083	Ribonucleoprotein polypeptide B	+3.2
SM21	NP_000994	Ribosomal	+2.2
SM1784	228176	Ribosomal protein P0	+5.5
SM1820	BC014277	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	-2.6
SM1801	AAA30799	Transfer RNA-Trp synthetase	+5.7
SM997	51077272	Translation initiation factor eif1	+2.3
세포 신호전달/교환			
SM464	AJ002189	Complete mitochondrial DNA	+2.7
면역반응			
SMk1	AAG52886	Kel-like protein 23	+4.6
미확인			
SM2152	BI327422	ARO78G01iTHYEG01S	-5.5
SMk3	AL13277	Chromosome 14 DNA sequence	+2.3
SM908	AAG28205	COI	+2.2
SM1738	CAA19420	DJ466P17.1.1(Laforin)	+3.5
SM1007	AAD31021	Foocen-m	+3.0
SM1724	XP_016035	Hypothetical protein	-2.6
SMk137	XP_002275	Hypothetical protein	+10.0
SM1972	XP_039195	Hypothetical protein	+2.8
SM787	AF192528	Integrin beta-1 subunit	+2.0
SM1474	BG384994	MARC 1PI	+2.8
SM1676	BG548727	NIH MGC 77	+2.3

<88>

ESTs No.	Accession No. †	Description**	유전자발현 비율 ESF(30)/ESM(30)
미확인			
SM1650	BI337009	Peripheral Blood Cell cDNA library	+7.3
SM1774	BAB30715	Putative	+5.1
SM1064	BAB28119	Putative	+3.0
SM1690	BF864360	Reinhardtii CC-1690	+2.5
SM96	M17733	Thymosin beta-4 mRNA	-3.9
SM1922	AAH03026	Unknown	+4.7
일치하지 않음			
SMk58		No match	+2.9
SM717		No match	-4.4
SMk6		No match	+2.4
SMk68		No match	+3.2
SMk80		No match	+4.3
SMk112		No match	+2.1
SM1639		No match	-2.8
SMk148		No match	+2.9
SM1665		No match	+9.8
SMk95		No match	+2.1
SMk152		No match	+6.4
SM1897		No match	+2.6
SMk138		No match	+3.1
SM796		No match	-2.2
SMk342		No match	+3.9
SMk181		No match	+4.4
SM904		No match	-2.7
SMk262		No match	+2.7
SM9		No match	+2.9
SM1964		No match	+2.6
SMk335		No match	+3.8

<89> †: 일치하는 accession no.

<90> **: 데이터베이스와 일치하는 정보

<91> No match: 데이터베이스에서 일치하는 정보가 없음; 신규한 EST

<92> ESM: early stage muscle(체중 30 kg), ESF: early stage fat(체중 30 kg)

<93> SM: 돼지 근육

<94> 상기 결과로부터, 본 발명자는 본 발명 돼지유전자 검색 및 기능분석용 cDNA 칩을 이용하여 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이하게 발현되는 유전자의 발현 프로파일을 밝혀내어 육질 개선 및 평가 시 사용가능성을 제시하였으며, 또한 성장에 관여하는 성장인자의 염기서열을 밝힘으로써 성장능력이 뛰어난 종돈 개량 시 응용가능성을 제시하였으며, 향후, 본 발명 cDNA 칩을 이용하여 돼지 품종별, 조직별로 유전자의 발현 프로파일을 검색 및 비교할 수 있고, 유전자 변이 검색, 유전자의 다형성 해석, 질병치료용 신약 개발 및 질병 진단이 가능하리라 사료된다.

<95> **실시예 2: 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 키트의 제작**

<96> 상기 실시예 1에서 제작된 cDNA 칩, Cy5-dCTP 또는 Cy3-dCTP과 결합시킨 검색 조직의 RNA에서 얻은 cDNA, 형광스캐닝시스템 및 컴퓨터분석시스템으로 이루어진 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 키트를 제작하였다.

【발명의 효과】

<97> 상기 실시예를 통하여 살펴본 바와 같이, 본 발명 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩에 관한 것으로, 돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 표지유전자군을 검출하기 위해 이들과 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 고착되어 있는 cDNA 칩을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 상기 cDNA 칩을 이용하여 돼지의 경제형질과 관련된 표지유전자군의 발현 프로파일을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 상기에서 제조된 cDNA 칩을 이용하여 돼지 품종별 조직별 유전자 발현의 비교, 유전자 변이 검색, 유전자

의 다형성 해석, 질병치료용 신약 개발 및 질병 진단, 종돈 개량에 응용될 수 있어 유전공학산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

돼지의 근육 및 지방 조직에서 특이적으로 발현되는 표지유전자를 검출할 수 있는 프로브 및 상기 프로브가 고정된 기질을 포함하는 돼지유전자 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 프로브는 표지유전자에 대한 돼지 근육 및 지방 조직 유래의 4434개의 ESTs(Expression Sequence Tags)를 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 프로브로부터 검출될 수 있는 세포의 구조와 이동과 관련된 표지유전자군은 1-알파 디네인 헤비 체인(1-alpha dynein heavy chain), 유사 19 kDa-인터랙팅 프로테인 3(19 kDa-interacting protein 3-like), 액틴(Actin), 액틴 알파 1(Actin alpha 1), 액틴 감마 2(Actin gamma 2), 아넥신 A2(Annexin A2), 아넥신 V(Annexin V), 아넥신 II(Annexin II), 베타-미오신 헤비 체인 mRNA(Beta-myosin heavy chain mRNA), 칼페인 라지 폴리펩타이드 L2(Calpain large polypeptide L2), 콜라겐(Collagen), 콜라겐 알파 1(Collagen alpha 1), 콜라겐 알파 2(Collagen alpha 2), 콜라겐 알파 V(Collagen alpha V), 초파리 디스크 라지 호몰로그 5(Discs, large(Drosophila) homolog 5), 피브로넥틴(Fibronectin), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 2(Heparan sulfate proteoglycan 2), 라민 A/C(Lamin A/C), 미오신(Myosin), 미오신 헤비 체인(Myosin heavy chain), 미오투블라린 관련 단백질 4(Myotubularin related protein 4), 프로콜라겐-프롤린(Procollagen-proline), 산성 분비단백질(Secreted protein

acidic), 트로포미오신(Tropomyosin), 트로포미오신 알파 체인(Tropomyosin alpha chain), 트로포닌 C(Troponin C), 튜블린 베타 체인(Tubulin beta chain) 및 비멘틴(Vimentin)을 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 프로브로부터 검출될 수 있는 대사와 관련된 표지유전자군은 알도라아제 A(Aldolase A), 카보네이트 디하이드라타아제(Carbonate dehydratase), 사이토크롬 C(Cytochrome C), 사이토크롬 C 옥시다아제 서브유닛 I(Cytochrome c oxidase subunit I), 사이토크롬 C 옥사다아제(Cytochrome-c oxidase), 프룩토오즈-1,6-비스포스파타아제(Fructose-1,6-bisphosphatase), L-락테이트 디하이드로게나아제 M 체인(L-lactate dehydrogenase M chain), LIM 도메인 1 단백질(LIM domains 1 protein), NADH 디하이드로게나아제(NADH dehydrogenase), NADH-유비퀴논 옥시도리덕타아제 체인 1((NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1), NADH4L, 옥타노일트랜스퍼라아제(Octanoyltransferase, COT), 포스포아르기닌 포스파타아제(Phosphoarginine phosphatase), 포스포글루코뮤타아제 이소폼 2 mRNA(Phosphoglucomutase isoform 2 mRNA), 프로테인-티로신 키나아제(Protein-tyrosine kinase), 피루베이트 키나아제(Pyruvate kinase), 사콜리핀(Sarcophilin), 티로신 포스파타아제 타입 IVA(Tyrosine phosphatase type IVA), UDP 글루코우즈 파이로포스포릴라아제(UDP glucose pyrophosphorylase), 글리코젠 포스포릴라아제 b(Glycogen phosphorylase b) 및 슈퍼록사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase)을 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 프로브로부터 검출될 수 있는 유전자 및 단백질 발현 관련 표지 유전자군은 일롱게이션 팩터 1 알파(Elongation factor 1 alpha), 일롱게이션 팩터 1 알파 1(Elongation factor 1 alpha 1), 에놀라아제 3(Enolase 3), 리피터티브 DNA 시퀀스 엘리먼트 RPE-1(Repetitive dna sequence element RPE-1), 소포체 단백질(Reticulum protein), 리보뉴클레오프로테인 폴리펩타이드 B(Ribonucleoprotein polypeptide B), 리보솜 단백질(Ribosomal protein), 리보솜 단백질 L18a(Ribosomal protein L18a), 리보솜 단백질 P0(Ribosomal protein P0), 트랜스퍼 RNA-Trp 신세타아제(Transfer RNA-Trp synthetase), 전사개시인자 eif1(Translation initiation factor eif1), LTM 도메인 1 단백질(LIM domains 1 protein) 및 메탈로프로티나아제 3의 조직 저해제(Tissue inhibitor of metalloproteinase 3)를 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 프로브로부터 검출될 수 있는 세포 신호전달/교환 관련 표지유전자군은 미토콘드리아 DNA(Complete mitochondrial DNA), 미토콘드리온(Mitochondrion), 포타슘 채널(Potassium channel) 및 크레아틴 키나아제 유사 유전자(Similar to creatine kinase)를 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 프로브로부터 검출될 수 있는 세포분열 관련 표지유전자는 프로테아제(Protease) 및 시스테인 1(cystein 1)을 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 8】

제 1항에 있어서, 상기 프로브로부터 검출될 수 있는 면역반응 관련 표지유전자군은 인터루킨-2 리셉터 알파 체인(Interleukin-2 receptor alpha chain), 켈 유사 단백질 23(Kel-like protein 23) 및 MHC 클래스 I SLA 유전체 부위(MHC class I SLA genomic region)를 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 9】

제 1항에 있어서, 상기 프로브로부터 검출될 수 있는 성장 관련 표지유전자군은 서열목록 서열 1 내지 5에 기재된 성장인자 I, II, III, IV 및 V의 염기서열 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 cDNA 칩.

【청구항 10】

제 1항의 cDNA 칩을 포함함을 특징으로 하는 돼지유전자의 검색 및 기능분석용 키트

【서열목록】

<110> KIM, Chulwook Gyeongsangnam-do <120> cDNA chip for screening
specific genes and analyzing their function in swine <160> 5 <170>
KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 660 <212> DNA <213> Kagoshima Berkshire <
400> 1 gagaccagca aatactatgt gaccatcatt gatgccccag gacacagaga cttcatcaaa
60 aacatgatta caggcacatc ccaggctgac tgtgctgtcc tgattgttgc tgctggtgtt 120
ggtgaatttg aagctggtat ctccaagaac gggcagaccc gcgagcatgc tcttctggct 180
tacaccctgg gtgtgaaaca gctgattgtt ggtgtcaaca aaatggattc caccgagcca 240
ccatacagtc agaagagata cgaggaaatc gttaaggaag tcagcaccta cattaagaaa 300

attggctaca accctgacac agtagcatTT gtgccaattt ctggttggaa tggtgacaac 360

atgctggagc caagtgctaa tatgccttgg ttcaagggat ggaaagtcac ccgcaaagat 420

ggcagtgcc a gtggcaccac gctgctggaa gcttttgatt gtatcctacc accaactcgt 480

ccaactgaca agcctctgcg actgcccctc caggatgtct ataaaattgg aggcattggc 540

actgtccctg tgggccgagt ggagactggg gttctcaaac ctggcatggg ggttaccttt 600

gctccagtca atgtaacaac tgaagtcaag tctgttgaaa tgcacatga agctttgagt 660

660 <210> 2 <211> 530 <212> DNA <213> Kagoshima Berkshire <400> 2

gctgactgat cgggagaatc agtctatctt aatcaccgga gaatccgggg caggaaagac 60

tgtgaacacg aagcgtgtca tccagtactt tgccacaatc gccgtcactg gggagaagaa 120

gaaggaggaa cctactcctg gcaaaatgca ggggactctg gaagatcaga tcatcagtgc 180

caacccccctg ctcgaggcct ttggcaacgc caagaccgtg aggaacgaca actcctctcg 240

ctttggtaaa ttcacagga tccacttcgg taccactggg aagctggctt ctgctgacat 300

cgaaacatat cttctagaga agtctagagt cactttccag ctaaaggcag aaagaagcta 360

ccacatTTTT tatcagatca tgtctaacaa gaagccagag ctattgaaa tgctcctgat 420

caccaccaac ccatatgact acgccttcgt cagtcaaggg gagatcactg tccccagcat 480

tgatgaccaa gaggagctga tggccacaga tagtgccatt gaaatcctgg 530 <210>

3 <211> 539 <212> DNA <213> Kagoshima Berkshire <400> 3 gttgttcctt

taaatatgat gttgccacaa gctgcattgg agactcattg cagtaatatt 60 tccaatgtgc

cacctacaag agagatactt caagtctttc ttactgatgt acacatgaag 120 gaagtaattc

agcagttcat tgatgtcctg agtgtagcag tcaagaaacg tgtcttgtgt 180 ttacctaggg

atgaaaacct gacagcaaat gaagttttga aaacgtgtga taggaaagca 240 aatgttgcaa

```

tctgttttc tgggggcatt gattccatgg ttattgcaac cttgtctgac      300 cgtcatattc
ctttagatga accaattgat cttcttaatg tagctttcat agctgaagaa      360 aagaccatgc
caactacctt taacagagaa gggaataaac agaaaaataa atgtgaaata      420 ccttcagaag
aattctctaa agatgttgct gctgctgctg ctgacagtcc taataaacat      480 tcagtgtacc
agatcgaatc acaggaaggg cgggactaaa ggaactacaa gctgttagc      539 <210>    4 <211>
419 <212>    DNA <213>    Kagoshima Berkshire <400>    4 catttatgag ggctacgcgc
tgccgcacgc catcatgcgc ctggacctgg cgggccgcga      60 tctcaccgac tacctgatga
agatcctcac tgagcgtggc tactccttct gaccacagct      120 gagcgcgaga tcgtgcgcga
catcaaggag aagctgtgct acgtggccct ggacttcgag      180 aacgagatgg cgacggccgc
ctcctcctcc tccctggaaa agagctacga gctgccagac      240 gggcagggtca tcaccatcgg
caacgagcgc ttccgctgcc cggagacgct cttccagccc      300 tccttcacgc gtatggagtc
ggcgggcatt cacgagacca cctacaacag catcatgaag      360 tgtgacatcg acatcaggaa
ggacctgtat gccaacaacg tcatgtcggg gggcaccac      419 <210>    5 <211>    507 <212>
DNA <213>    Kagoshima Berkshire <400>    5 tatatagaac cgaatcacgt aactggggcc
tgaccaagca gggccaaaac aaggcaacct      60 aggaggttat aaaataggta tacgcgcgct
gacacataca tactcactac ccgaacgcgg      120 ggacaactag ggctccgcca taagccatcc
tttcttggtc gtcgatgttg cgggctgcag      180 ttatagggct gccaaccgcc atacacacct
taccagccac ttattaagtt acatccacga      240 gggctctgta ccaccctaa gcagtggcag
tggtagccgc tgcccgtta cctgctgcag      300 tgttggtgct agctccgtcc taagcttccc
cgatagccgc cgctttttac acaccatcgg      360 cggactagac accgttggtt gcagcgtaag
cgtctatggc agcagctgcg gcgaccgccg      420 tgtagccagc ttactacatg ttagtttcag

```

10-2030083651

출력 일자: 2004/1/13

caaccaccct gccaatacc gtgttccta

480 ctccaactct gtcggtttca gccgcag

507